

DT05 Rec'd PCT/PTO 26 JAN 2003

DOCKET NO.: 264690US2PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Nathalie PICOLLET-DAHAN, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP03/15044

INTERNATIONAL FILING DATE: August 28, 2003

FOR: DEVICE FOR MEASURING THE ELECTRICAL ACTIVITY OF BIOLOGICAL
ELEMENTS AND ITS APPLICATIONS**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 10663	28 August 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/EP03/15044. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Marvin J. Spivak
Attorney of Record
Registration No. 24,913
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Rec'd PCT/PTC 26 JAN 2005 #21

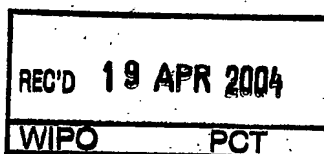
PCT/EP03/15044



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 25 JUIL. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Planché", enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

DPN 03/04/01

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260999

REMISE DES PIÈCES DATE 28 AOUT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0210663 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 28 AOUT 2002 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREVATOME 3 rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B 14141.3 SL (DD 2352)			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE D'ELEMENTS BIOLOGIQUES ET SES APPLICATIONS			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public de caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	31-33 rue de la Fédération	
	Code postal et ville	75752	PARIS 15ème
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 28 AOÛT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0210663 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		B 14141.3 SL (DD 2352)	
6 MANDATAIRE			
Nom		LENOIR	
Prénom		Sophie	
Cabinet ou Société		BREVATOME 422.5/S002	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		7068 du 12.06.98	
Adresse	Rue	3 rue du Docteur Lancereaux	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.83.94.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.63.83.33	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		brevets.patents@brevaalex.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
S.LENOIR 422-5 S/002		L. GUICHET	

DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE
D'ELEMENTS BIOLOGIQUES ET SES APPLICATIONS

DESCRIPTION

5

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à un dispositif de mesure de l'activité électrique d'un ou plusieurs éléments biologiques, et plus spécialement à
10 un dispositif permettant de mesurer en parallèle l'activité électrique d'une pluralité d'éléments biologiques.

Elle se rapporte également aux applications de ce dispositif.

15 Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend par "élément biologique", tout élément naturel ou artificiel dont au moins une partie est formée d'une membrane biologique ou reproduit les caractéristiques structurelles et/ou fonctionnelles d'une membrane
20 biologique.

Ainsi, il peut s'agir d'une cellule biologique entière ou d'un organelle de cellule biologique du type vacuole, appareil de golgi, mitochondrie, réticulum endoplasmique, lysosome,..., d'un
25 fragment de membrane biologique, agrémenté ou non de parties cytosoliques, d'une bicouche lipidique artificielle tel qu'un film de phosphatidylcholine ou de phosphatidylglycérol, dotée d'un ou plusieurs pores protéiques, ou encore d'une membrane biomimétique.

30 La genèse et la transmission des signaux électriques présents dans les cellules biologiques est

sous la dépendance de protéines transmembranaires qui forment des pores dans l'épaisseur des membranes plasmiques et assurent le passage d'ions (Na^+ , Ca^{++} , K^+ et Cl^-) au travers de ces membranes, d'où leur nom de canaux ioniques. La plupart de ces canaux ioniques s'ouvre en réponse à une perturbation spécifique de la membrane dans laquelle ils se trouvent et qui peut être liée, soit à un changement du potentiel électrique de cette membrane (on parle alors de canaux sensibles au voltage ou voltage dépendants), soit à la fixation d'un ligand sur un récepteur membranaire (on parle alors de récepteurs-canaux).

On sait aujourd'hui qu'un dysfonctionnement de certains canaux ioniques est impliqué dans des pathologies majeures parmi lesquelles on peut citer l'épilepsie, les myotonies, l'ataxie cérébro-spinale, l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, les arythmies comme le syndrome de quadriarythmie ventriculaire et le syndrome de Jervell et Lange Nielsen, la mucoviscidose, le diabète et certaines affections rénales comme les syndromes de Bartter et Gritelman et le pseudohypoaldostéronisme (PHDA) de type 1. De même, certains canaux ioniques apparaissent être impliqués dans la genèse et la régulation des messages nociceptifs qui sont à l'origine des douleurs aiguës et des douleurs chroniques.

Le dispositif selon l'invention est donc susceptible de constituer un outil de choix pour la recherche pharmaceutique, et notamment pour la réalisation d'études visant à mieux comprendre les mécanismes responsables au niveau cellulaire des

affections liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques, à identifier les sites et les modes d'action des médicaments déjà reconnus comme efficaces dans le traitement de ces affections et, à partir de là, à
5 développer de nouveaux médicaments plus actifs et plus spécifiques que ceux dont on dispose déjà.

En particulier, le dispositif selon l'invention peut trouver une application dans le domaine de la pharmacologie, pour l'étude d'antidotes,
10 de médicaments contre certains poisons ou venins, par exemple de scorpions), pour le criblage à moyen ou haut débit de molécules ayant pour cibles des canaux ioniques et pouvant, de ce fait, présenter un intérêt thérapeutique, ou de candidats médicaments afin
15 d'évaluer leurs effets et/ou leur toxicité, ainsi que dans le domaine de la pharmacovigilance.

Il peut également être utilisé pour le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques.

20 Par ailleurs, les canaux ioniques de type récepteurs-canaux peuvent être utilisés comme "capteurs" ("channel sensors"), dans la mesure où toute modification de leur activité électrique traduit la présence d'une molécule qu'ils sont aptes à détecter.
25 Dès lors, le dispositif selon l'invention est également susceptible d'être utilisé dans le domaine de l'environnement, par exemple pour détecter des polluants, dans les industries qui effectuent des contrôles qualité sur leurs chaînes de fabrication et
30 sur les produits qui en sont issus comme les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi

que dans tous les autres secteurs où il est usuel d'effectuer des analyses toxicologiques.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

5 C'est en 1981 qu'a été mise au point par NEHER et SAKMANN la technique d'étude des canaux ioniques qui est encore la plus performante aujourd'hui, à savoir le "patch-clamp" (HAMILL et al. *Pflügers Arch.*, 1981, 391:85-100) [1]. Cette technique
10 permet de contrôler ("clamp") les différences de potentiel électrique transmembranaire au niveau d'un fragment ("patch") de membrane plasmique ou d'une cellule entière et, partant, d'accéder directement aux flux ioniques circulants au travers des canaux ioniques
15 de ce fragment de membrane ou de cette cellule.

En pratique, elle consiste à appliquer une micropipette en verre sur la membrane plasmique d'une cellule et à établir, par aspiration dans la micropipette, un scellement de haute résistance, de
20 l'ordre du gigaohm (d'où le fait qu'il est usuellement désigné par le terme anglo-saxon "gigaseal"), entre l'extrémité de cette micropipette et le fragment de membrane sur lequel elle se trouve (configuration "cell-attached"), l'aspiration pouvant être poursuivie
25 jusqu'à obtenir l'ouverture de ce fragment de membrane (configuration "whole-cell"). Le fragment de membrane peut être isolé du reste de la cellule par excision mécanique : on parle alors de configurations "inside-out" ou "outside-out".

Il est alors possible, en appliquant une tension électrique constante au fragment de membrane ou à la cellule et en enregistrant les variations de cette tension, de mesurer l'activité électrique résultant d'un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques situés sur le seul fragment de membrane isolé en configuration "cell-attached" ou excisée, ou sur l'intégralité de la membrane cellulaire en configuration "whole-cell".

10 S'il est incontestable que la technique de "patch-clamp" a permis à la recherche, du fait de sa sensibilité, de faire des avancées considérables dans la connaissance des canaux ioniques, et à l'industrie pharmaceutique de disposer d'un outil de criblage de
15 molécules aptes à agir sur les canaux ioniques, il s'avère qu'elle ne donne pas totalement satisfaction.

En effet, elle présente, en premier lieu, l'inconvénient d'être très sensible aux bruits électriques et aux vibrations du milieu environnant et, par conséquent, de nécessiter une infrastructure
20 relativement importante (tables anti-vibrations, cages de Faraday, ...) destinée à neutraliser les effets interférents de ces bruits et vibrations.

Par ailleurs, il s'agit d'une méthode
25 entièrement manuelle, qui est assez lourde à mettre en œuvre, notamment en raison de ce que les micropipettes en verre qu'elle utilise, doivent être préparées avant chaque mesure par étirage et usinage de capillaires, et qui requiert la présence d'un expérimentateur hautement
30 qualifié, en particulier pour positionner convenablement ces micropipettes et pour obtenir le

gigaseal, sachant que l'aspiration qui permet de réaliser ce gigaseal est effectuée à la bouche.

Au surplus, le nombre d'échantillons pouvant être examinés par unité de temps est assez
5 faible et le pourcentage d'échecs important. A titre indicatif, un expérimentateur chevronné en patch-clamp est susceptible de réaliser au mieux 20 mesures par jour.

On comprend dès lors que la technique de
10 patch-clamp ne peut permettre ni la réalisation d'un criblage pharmacologique à moyen ou haut débit comme le souhaite la recherche pharmaceutique, ni celle de tests de routine comme le requiert l'utilisation des canaux ioniques en tant que capteurs.

15 Les limites de la technique de patch-clamp telle que proposée par NEHER et SAKMANN conjuguées au fait que les progrès de la génomique et des technologies de l'information ont permis de mettre en évidence à la fois une grande diversité et une grande
20 complexité des canaux ioniques, ont conduit à l'émergence, au cours de ces dernières années, de nombreuses tentatives d'amélioration de cette technique.

Schématiquement, deux voies ont été
25 explorées : d'une part, celle qui vise à automatiser les mesures tout en utilisant les mêmes électrodes que dans la technique originelle (micropipettes en verre) et, d'autre part, celle qui vise à réaliser les mesures sur des puces électroniques.

Ainsi, par exemple :

5 - la société NEUROSEARCH a développé un
appareillage de reconnaissance cellulaire automatique
et de mesure sur huit cellules individualisées dans des
chambres séparées. Cet appareillage, qui est décrit
dans WO-A-96/13721 [2], permet de réaliser des mesures
d'activité électrique avec un bon rendement. Néanmoins,
les cellules étant mises en culture et "patchées" sur
des surfaces solides, il nécessite une sélection très
10 précise des cellules ainsi que l'utilisation d'un
système de positionnement de la pipette servant à
réaliser le scellement de haute résistance, propre à
éviter que les électrodes d'enregistrement en verre ne
se cassent.

15 - la société SOPHION BIOSCIENCES a mis au
point un substrat type permettant d'enregistrer des
événements électriques au sein de membranes
biologiques. Ce substrat, qui est décrit dans
WO-A-01/25769 [3], présente une pluralité de sites, de
20 section droite carrée et dans lesquels sont intégrées
des électrodes. A l'usage, il apparaît toutefois que
ces sites se prêtent mal à l'obtention d'un scellement
de haute résistance avec les cellules.

25 - la société CENES a introduit un nouveau
système de patch-clamp permettant de mesurer l'activité
électrique de cellules entières. Ce système, qui est
décrit dans WO-A-01/71349 [4], prévoit de mettre en
suspension les cellules dans un milieu liquide et de
les présenter à une électrode, au niveau d'une
30 interface air/liquide dans un capillaire en verre. Ce
système présente l'avantage de supprimer les problèmes

induits par les vibrations émises par le milieu environnant et ne pas nécessiter un positionnement très précis de l'électrode. Cependant, il ne permet pas de conduire des mesures en parallèle.

5 - cette même société a également proposé, dans WO-A-99/66329 [5], un substrat poreux ou perforé, arrangé en puits et de part et d'autre duquel se trouvent des électrodes. Les cellules sont positionnées sur ce substrat sous la forme d'une couche cellulaire
10 en sorte qu'il ne permet pas d'effectuer des mesures sur des cellules individualisées.

 - la société CYTION a, elle, décrit dans WO-A-99/31503 [6], un dispositif de positionnement de cellules qui a la particularité de ne comprendre qu'un
15 seul site intégré de mesure par puce et d'être dénué de structure permettant le confinement des cellules. Il en résulte un risque non négligeable d'étalement des cellules et de présence de plusieurs cellules sur un même site.

20 - enfin, la société AXON travaille actuellement sur un projet de dispositif qui utilise les électrodes planes en élastomère silicone proposées par YALE UNIVERSITY dans sa demande internationale WO-A-01/59447 [7]. Les premiers essais montrent que ce
25 dispositif nécessite encore de faire l'objet d'importantes améliorations.

 Les Inventeurs se sont donc fixé pour but de fournir un dispositif qui permette de mesurer l'activité électrique d'éléments biologiques, et
30 notamment de cellules, selon les principes du patch-clamp, afin de bénéficier des avantages de cette

technique, en particulier en termes de sensibilité, mais sans toutefois en avoir les inconvénients, de manière à ce qu'il soit possible d'effectuer avec ce dispositif des mesures simultanées d'activité
5 électrique cellulaire à une cadence et avec une fiabilité autorisant notamment son utilisation pour le criblage à moyen et haut débit de substances potentiellement intéressantes en thérapeutique ou la réalisation de tests de routine, en particulier de
10 diagnostic ou de toxicité.

Les Inventeurs se sont également fixé pour but de fournir un dispositif qui, tout en présentant ces avantages, ait des coûts de fabrication et d'exploitation satisfaisants.

15

EXPOSE DE L'INVENTION

Ces buts sont atteints par la présente invention qui propose un dispositif de mesure de l'activité électrique d'au moins un élément biologique,
20 lequel dispositif comprend un substrat sensiblement plan comportant une face inférieure et une face supérieure et présentant au moins une ouverture pour le logement de cet élément, et est caractérisé en ce que :

- il comprend deux plaques sensiblement
25 planes, qui sont disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, chacune de ces plaques étant munie, sur sa face disposée en regard du substrat, d'au moins une électrode, cette électrode étant située en vis-à-vis de l'ouverture du substrat ;

- ces plaques et l'ouverture du substrat délimitent une chambre qui est remplie, en condition d'utilisation du dispositif, d'un milieu liquide ; et

- chacune des plaques disposées de part et d'autre du substrat comporte au moins un canal qui prend naissance à l'intérieur de ladite chambre et qui relie cette dernière à l'extérieur dudit dispositif.

Ainsi, le dispositif selon l'invention comprend, pour chaque élément biologique dont on souhaite mesurer l'activité électrique :

- une chambre qui est prévue pour être remplie d'un milieu liquide au sein duquel l'élément biologique est destiné à baigner dans un logement prévu à cet effet, ledit milieu liquide servant à assurer la conduction d'un courant électrique et la survie de l'élément biologique, si celui-ci est vivant ;

- une paire d'électrodes qui sont réparties sur deux plaques dont l'une forme le sommet de la chambre tandis que l'autre en forme la base, et qui sont disposées en vis-à-vis du logement de l'élément biologique, ces électrodes ayant pour fonction de permettre l'application à cet élément d'une tension électrique et l'enregistrement des variations de cette tension consécutives à un changement d'état (ouverture ou fermeture) de ses canaux ioniques ; et

- au moins deux canaux qui relient l'intérieur de la chambre avec l'extérieur du dispositif, et dont l'un prend naissance à la base de la chambre et est destiné à permettre la réalisation d'un scellement de haute résistance entre l'élément biologique et son logement, par création d'une

dépression dans cette chambre, tandis que l'autre prend naissance au sommet de la chambre et est destiné à permettre l'introduction de substances dans cette chambre et/ou l'évacuation de ces substances hors de ladite chambre.

Selon une première disposition avantageuse de l'invention, l'ouverture du substrat comprend trois parties coaxiales, à savoir une partie supérieure, une partie médiane et une partie inférieure, les parties supérieure et médiane formant une cuvette pour le logement de l'élément biologique, tandis que la partie inférieure forme un espace qui est apte à loger un volume de milieu liquide suffisant pour y créer, par aspiration, une dépression propre à induire, entre ladite cuvette et l'élément biologique, un scellement d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm.

De préférence, la cuvette de logement de l'élément biologique (qui sera désignée, dans ce qui suit, uniquement par le terme "cuvette" par commodité) a la forme d'un entonnoir, dont la partie tronconique correspond à la partie supérieure de l'ouverture du substrat et sert de réceptacle à l'élément biologique, et dont la partie cylindrique correspond à la partie médiane de cette ouverture et sert à la réalisation du scellement de haute résistance entre cet élément et ladite cuvette.

Cette forme de cuvette en entonnoir s'est, en effet, révélée être la plus apte à assurer le confinement de l'élément biologique, le respect de sa forme et de son intégrité, notamment lorsqu'il s'agit d'une cellule biologique, ainsi que la déformation de

sa membrane lors de la création d'une dépression dans l'espace sous-jacent et, par voie de conséquence, à permettre l'obtention du scellement de haute résistance.

5 Conformément à l'invention, les dimensions de la partie tronconique de la cuvette servant de réceptacle à l'élément biologique, sont, de préférence, adaptées aux dimensions de cet élément, ce qui permet d'améliorer encore son confinement et l'obtention du
10 scellement de haute résistance.

Ainsi, par exemple, lorsque l'élément biologique est une cellule de taille conventionnelle, c'est-à-dire mesurant de l'ordre de 10 à 30 μm de diamètre comme c'est le cas d'un lymphocyte, la partie
15 tronconique de la cuvette - qui correspond à la partie supérieure de l'ouverture du substrat - a, de préférence, son plus grand diamètre compris entre 20 et 100 μm , son plus petit diamètre compris entre 10 et 30 μm et une hauteur comprise entre 10 et 50 μm , tandis
20 que la partie cylindrique de cette cuvette - qui correspond à la partie médiane de l'ouverture du substrat - a, de préférence, un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm et une hauteur inférieure ou égale à 100 μm .

25 En variante, lorsque l'élément biologique est une grosse cellule, c'est-à-dire mesurant de l'ordre de 0,7 à 1 mm de diamètre comme c'est le cas d'un ovocyte, la partie tronconique de la cuvette a, de préférence, son plus grand diamètre compris entre
~~préférence, son plus grand diamètre compris entre~~
30 500 μm et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600 μm et une hauteur comprise entre 300 μm et

10 mm, tandis que la partie cylindrique de cette cuvette présente, de préférence, un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm et une hauteur inférieure ou égale à 100 μm .

5 Dans tous les cas, la partie inférieure de l'ouverture du substrat est, de préférence, cylindrique et mesure avantageusement entre 10 et 100 μm de diamètre pour une hauteur de 300 à 700 μm .

10 Selon une autre disposition avantageuse du dispositif selon l'invention, le substrat est constitué d'un ou plusieurs matériaux micro-usinables, le micro-usinage étant, en effet, une technique convenant particulièrement bien à la réalisation d'ouvertures de dimensions allant d'un dixième de micron à quelques
15 centaines de microns.

De préférence, le substrat est à base de silicium et est formé de deux plaques de silicium superposées qui sont solidaires d'une membrane intermédiaire, laquelle est constituée d'un matériau
20 isolant, compatible avec les techniques de microtechnologie. Ce matériau peut être un matériau minéral tel qu'un oxyde (SiO_2 par exemple) ou un nitrure (Si_3N_4 par exemple), ou un matériau organique (polyimide par exemple).

25 Dans ces conditions, la partie tronconique de la cuvette correspond à un évidement réalisé dans l'une des deux plaques de silicium ; sa partie cylindrique correspond à un évidement réalisé dans la membrane intermédiaire, tandis que la partie inférieure
30 de l'ouverture du substrat correspond à un évidement réalisé dans l'autre plaque de silicium.

Bien entendu, d'autres matériaux micro-usinables peuvent parfaitement être utilisés pour la réalisation du substrat comme le verre et les matières plastiques.

5 Selon encore une autre disposition avantageuse du dispositif selon l'invention, le substrat comprend de plus, sur sa face supérieure, un film qui est constitué d'un matériau éventuellement souple, biocompatible, et qui est muni d'au moins une
10 ouverture, cette ouverture étant coaxiale avec la partie supérieure de l'ouverture sous-jacente du substrat et de même géométrie qu'elle, mais de section droite médiane supérieure à la sienne.

Cette disposition, qui est notamment utile
15 dans le cas où l'on souhaite mesurer l'activité électrique de grosses cellules, permet, non seulement d'optimiser le confinement de ce type de cellules, mais également de réduire l'épaisseur de la partie du substrat réalisée dans le matériau micro-usinable et
20 ainsi d'abaisser le coût de fabrication de ce substrat par rapport à ce qu'il serait s'il était entièrement réalisé dans un matériau micro-usinable comme le silicium.

De manière préférée, l'ouverture du film
25 situé sur la face supérieure de la partie sous-jacente du substrat est tronconique et a son plus grand diamètre compris entre 500 μm et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600 μm et une hauteur
comprise entre 300 μm et 1 mm.

30 Avantageusement, ce film est réalisé par moulage afin que son coût de fabrication soit

suffisamment bas pour qu'il puisse être remplacé par un film neuf à chaque nouvelle utilisation du dispositif, et est donc constitué d'un matériau apte à être moulé comme un thermoplastique du type polytétrafluoroéthylène (PTFE), ou un élastomère silicone comme un polydiméthylsiloxane (PDMS).

Selon la nature du matériau qui le constitue et du matériau qui constitue la partie sous-jacente du substrat, ce film peut être maintenu sur cette dernière, soit par collage, soit par un effet d'adhésion sous l'effet d'une pression.

Conformément à l'invention, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, qui peuvent être identiques ou différentes, sont, de préférence, constituées d'un matériau isolant, par exemple un verre époxy, tandis que les électrodes portées par ces plaques sont, de préférence, des électrodes planes.

Ces dernières peuvent notamment être des plots d'Ag/AgCl⁻ mais d'autres couples d'oxydo-réduction peuvent également être utilisés comme un couple Pt/PtCl⁻.

Dans tous les cas, les électrodes sont prévues pour être reliées, après assemblage des différents éléments du dispositif, à un circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique.

Selon encore une disposition avantageuse de l'invention, la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat comporte deux canaux, à savoir un canal pour l'introduction de substances dans la

chambre, et un canal pour l'évacuation de ces substances hors de cette chambre.

Ces canaux pour l'introduction et l'évacuation de substances traversent, de préférence, la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat verticalement et sont prévus pour être respectivement reliés, de manière transitoire ou permanente, à des capillaires permettant de les relier respectivement à un système, automatique ou manuel, de distribution de liquides et à un système, automatique ou manuel, d'aspiration de liquides, ces deux systèmes pouvant être connectés l'un à l'autre de manière à assurer une recirculation desdites substances dans la chambre.

De manière similaire, le canal que comporte la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat et qui est, lui, destiné à permettre la réalisation du scellement de haute résistance, traverse, de préférence, cette plaque verticalement, et est prévu pour être relié, de manière transitoire ou permanente à un capillaire permettant de le raccorder à un système d'aspiration de liquides.

Selon une disposition préférée du dispositif selon l'invention, l'ouverture du substrat, les électrodes ainsi que le canal que comporte la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat sont coaxiaux, cette disposition permettant notamment d'optimiser l'obtention du scellement de haute résistance entre la cuvette et l'élément biologique, l'application à ce dernier de la tension électrique nécessaire à la mesure de son activité

électrique, l'enregistrement des variations de cette tension et, partant, la qualité des mesures ainsi effectuées.

Selon une autre disposition préférée du
5 dispositif selon l'invention, celui-ci comprend des moyens pour étancher la chambre, lesquels servent également à amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant, et qui seront désignés, dans ce qui suit, uniquement par
10 l'expression "moyens d'étanchéité" par commodité.

Ces moyens d'étanchéité consistent, de préférence, en un premier joint, qui est intercalé entre le substrat et la plaque disposée en regard de la face inférieure de ce substrat et en un deuxième joint,
15 identique ou non au précédent, qui est intercalé entre le substrat et la plaque disposée en regard de la face supérieure de ce substrat, chacun de ces joints étant muni d'au moins une perforation disposée et dimensionnée de manière à circonscrire l'électrode
20 située sur la plaque au contact de laquelle il se trouve.

Avantageusement, ces joints sont constitués d'un matériau qui, outre d'être étanche aux liquides, est souple, légèrement compressible et est apte à être
25 moulé de manière à ce qu'ils puissent être réalisés par moulage, ce qui permet, d'une part, de les adapter parfaitement à la configuration du substrat et, d'autre part, de les fabriquer à un coût suffisamment faible pour qu'il soit possible de les remplacer par des
30 joints neufs à chaque nouvelle utilisation du dispositif. Un tel matériau est, par exemple, un

élastomère comme un élastomère silicone tel qu'un polydiméthylsiloxane.

Selon encore une autre disposition préférée, le substrat, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les moyens d'étanchéité lorsque ces derniers sont présents sont des modules qui sont assemblés de manière amovible.

Dans ce cas, le dispositif selon l'invention comprend avantageusement des moyens pour maintenir ces modules en condition d'assemblage.

Ces moyens de maintien peuvent être des moyens solidaires des plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, et qui coopèrent pour fixer de manière amovible ces plaques l'une à l'autre, comme des charnières, des glissières ou des moyens de vissage. Ils peuvent également être des moyens indépendants de ces plaques et qui s'emboîtent sur les bords de l'empilement constitué par les différents modules.

L'assemblage des modules, et plus particulièrement l'alignement des axes des ouvertures du substrat, des électrodes portées par les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat, et des perforations des moyens d'étanchéité, peuvent être facilités par la présence, notamment sur lesdites plaques, de moyens de guidage mécaniques (ergots d'alignement, rainures en coin, ...), optiques (fibres optiques passant dans des trous préformés) ou autres.

Conformément à l'invention, on préfère que le dispositif permette de mesurer en parallèle l'activité électrique de plusieurs éléments biologiques, auquel cas :

5 - le substrat présente une pluralité d'ouvertures identiques et régulièrement espacées les unes des autres ;

 - les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat sont
10 des circuits imprimés qui sont munis chacun d'autant d'électrodes que le substrat comporte d'ouvertures ;

 - la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat comporte au moins autant de canaux que le substrat comporte d'ouvertures ;

15 - la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat comporte au moins autant de canaux pour l'introduction de substances et au moins autant de canaux pour l'évacuation de substances que le substrat comporte d'ouvertures ;

20 ledit substrat et ses ouvertures, lesdites plaques, lesdites électrodes et lesdits canaux étant tels que précédemment définis.

 Selon un mode de réalisation préféré de ce dispositif, celui-ci comprend de plus deux joints
25 identiques, munis chacun d'autant de perforations que le substrat comporte d'ouvertures, ces joints et ces perforations étant tels que précédemment définis.

 Par ailleurs, selon ce mode de réalisation préféré, le dispositif comprend encore deux pinces
30 identiques, qui s'emboîtent sur les bords de l'empilement constitué par le substrat, les plaques

disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les joints.

Dans ces conditions, le dispositif selon l'invention, bien que comprenant sept éléments, se compose de cinq modules différents qui peuvent être
5 assemblés et désassemblés à volonté, le substrat correspondant à un premier module, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat correspondant respectivement à
10 un deuxième et à un troisième module, les joints correspondant à deux exemplaires d'un quatrième module, tandis que les pinces correspondent à deux exemplaires d'un cinquième module.

Le dispositif selon l'invention présente de
15 nombreux avantages.

En effet, tout en permettant d'effectuer des mesures d'activité électrique cellulaire selon les principes du patch-clamp, il simplifie considérablement la mise en œuvre de cette technique :

20 - d'une part, en supprimant les opérations de préparation des micropipettes en verre et de manipulation de ces micropipettes, l'opération d'aspiration à la bouche nécessaire à l'obtention du gigaseal, la nécessité d'utiliser un microscope ainsi
25 que des appareillages propres à éviter, ou à tout le moins, limiter les interférences avec les bruits électriques et les vibrations émis dans le milieu environnant ; et

- d'autre part, en offrant la possibilité
30 d'automatiser en tout ou partie ces mesures d'activité électrique, et notamment la réalisation du scellement

de haute résistance, la distribution de substances dans des chambres indépendantes les unes des autres, l'application de la tension électrique et l'enregistrement des variations de cette tension, en plaçant les systèmes d'aspiration et de distribution de substances ainsi que le circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique sous le contrôle d'un système informatique.

Il en résulte que le dispositif selon l'invention rend la technique du patch-clamp accessible à des laboratoires et des utilisateurs n'ayant aucune expérience dans ce domaine. Il en résulte également qu'il permet de réaliser des mesures d'activité électrique cellulaire avec un rendement très satisfaisant tout en garantissant la fiabilité, et notamment la reproductibilité, de ces mesures.

Par ailleurs, il offre une grande souplesse d'utilisation, dans la mesure où il permet d'effectuer des mesures d'activité électrique aussi bien sur une pluralité de cellules traitées simultanément que sur une seule cellule, en configuration "cell-attached" comme en configuration "whole-cell", et, dans le cas où les mesures sont conduites en parallèle sur plusieurs cellules, en utilisant des paramètres qui peuvent être différents d'une cellule à l'autre. Ainsi, par exemple, le milieu de survie, la substance à tester ou à détecter, la concentration de cette substance, la tension électrique peuvent être différents d'une cellule à l'autre.

Il peut, de plus, accueillir, outre des cellules entières, soit des organelles de cellules

biologiques, soit des fragments de membranes biologiques agrémentés ou non de parties cytosoliques, soit des bicouches lipidiques artificielles, soit encore des membranes biomimétiques.

5 Cette souplesse d'utilisation est encore accrue lorsque le dispositif selon l'invention est un système modulaire puisque, dans ce cas, les différents modules peuvent être remplacés ou, au contraire, réutilisés d'une mesure à l'autre ou d'une série de
10 mesures à l'autre.

 Enfin, il est susceptible d'être fabriqué à des coûts extrêmement intéressants, notamment lorsqu'il se présente sous la forme d'un système modulaire puisque, dans ce cas, sa fabrication ne comporte pas
15 d'opération d'assemblage, ni d'opération de contrôle de la qualité de cet assemblage. De manière similaire, les coûts d'exploitation d'un tel dispositif peuvent être très avantageux, dans la mesure où il est possible de remplacer certains des modules qui le constituent, soit
20 parce qu'ils sont prévus pour être à usage unique, soit parce qu'ils se sont altérés, tout en conservant les autres.

 Compte tenu de ce qui précède, le dispositif selon l'invention est susceptible de
25 constituer un outil de choix pour le criblage de molécules à visée thérapeutique, le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques, et pour la détection de substances toxiques, que ce soit dans le domaine de l'environnement ou dans
30 les industries agroalimentaire, pharmaceutique ou cosmétique.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de réalisation d'un
5 dispositif selon l'invention et qui est donné à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

10 La figure 1 est une représentation schématique d'un dispositif selon l'invention, vu en perspective éclatée, dans une forme de réalisation conçue pour la mesure en parallèle de l'activité électrique de neuf cellules biologiques.

15 La figure 2 est une représentation schématique du dispositif de la figure 1, vu en coupe suivant le plan P de cette figure 1.

Les figures 3 à 5 sont des représentations schématiques d'une portion d'un dispositif selon
20 l'invention, dans une vue analogue à celle de la figure 2, mais pour trois variantes de réalisation de ce dispositif.

La figure 6 est une représentation schématique d'une portion, vue en coupe, du substrat entrant dans la constitution d'un dispositif selon
25 l'invention, dans une variante de réalisation adaptée à la mesure de l'activité électrique de grosses cellules.

EXPOSE DETAILLE D'EXEMPLES DE REALISATION

On se réfère tout d'abord aux figures 1 et 2 qui représentent de façon schématique un dispositif 10 selon l'invention, dans une forme de réalisation
5 conçue pour permettre une mesure en parallèle de l'activité électrique de neuf cellules biologiques.

La figure 1 étant une vue en perspective éclatée, elle montre les différents éléments constitutifs du dispositif 10 avant leur assemblage,
10 tandis que la figure 2, qui correspond à une coupe suivant le plan P de la figure 1, montre ces mêmes éléments une fois assemblés les uns aux autres.

Comme visible sur les figures 1 et 2, le dispositif 10, qui est de forme générale carrée, se
15 compose de sept éléments aptes à être assemblés les uns aux autres de manière amovible, à savoir :

- un premier circuit imprimé 11, qui forme le fond de ce dispositif ;

- un substrat 12, sensiblement plan, qui
20 est disposé au-dessus du circuit imprimé 11 et qui a pour fonction d'assurer un confinement des cellules 18 grâce à des ouvertures 120 qu'il comporte ;

- un deuxième circuit imprimé 13, qui est lui-même disposé au-dessus du substrat 12 et qui forme
25 le couvercle du dispositif 10 ; ce circuit imprimé délimite, conjointement avec le circuit imprimé 11 et les ouvertures 120 du substrat 12 des chambres 19 au centre desquelles les cellules dont on veut mesurer
l'activité électrique vont être placées, à raison d'une
30 cellule par chambre, et qui sont donc destinées à être

remplies d'un milieu extracellulaire ou faisant fonction de milieu extracellulaire ;

- deux joints perforés 14 et 15, qui sont intercalés entre le circuit imprimé 11 et le substrat 12 pour le premier, et entre ce substrat et le circuit imprimé 13 pour le deuxième, et qui servent à assurer l'étanchéité du dispositif, notamment entre les chambres 19, ainsi qu'à amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant ; et
- deux pinces 16 et 17, qui ont pour fonction de maintenir les éléments précédents en condition d'assemblage.

Ces sept éléments correspondent à 5 modules différents : ainsi, le circuit imprimé 11 correspond à un premier module ou module A ; le substrat 12 correspond à un deuxième module ou module B ; le circuit imprimé 13 correspond à un troisième module ou module C ; les joints 14 et 15 correspondent à deux exemplaires d'un quatrième module ou module D, tandis que les pinces 16 et 17 correspondent à deux exemplaires d'un cinquième module ou module E.

Comme montré par les figures 1 et 2, le substrat 12 ou module B, qui représente l'élément médian du dispositif 10, comprend neuf ouvertures réparties sur trois lignes et trois colonnes.

Ces ouvertures ont une double fonction, à savoir, d'une part, former des microcuvettes aptes à permettre le confinement des cellules dont on veut mesurer l'activité électrique et, d'autre part, autoriser la réalisation, entre ces cuvettes et ces cellules, d'un "gigaseal", c'est-à-dire d'un scellement

d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm, sous l'effet de la création d'une dépression au sein de la partie des chambres 19 située au-dessous de ces cuvettes.

5 De ce fait, comme visible sur la figure 2, le substrat 12 est formé de deux plaques superposées, respectivement 121 et 123, qui sont réunies par une membrane intermédiaire 122 dont elles sont solidaires, ces plaques et cette membrane étant évidées de telle
10 sorte que :

- d'une part, les cuvettes destinées au confinement des cellules 18 ont la forme d'entonnoirs, dont les parties tronconiques correspondent à des évidements tronconiques réalisés dans la plaque 121, et
15 dont les parties cylindriques correspondent à des évidements cylindriques réalisés dans la membrane intermédiaire 122 ; et

- d'autre part, les cuvettes communiquent avec des espaces cylindriques 125 sous-jacents, de même
20 axe qu'elles et qui correspondent à des évidements cylindriques réalisés dans la plaque 123 et qui sont aptes à loger un volume de milieu liquide suffisant pour y créer, par aspiration, la dépression nécessaire à l'obtention du gigaseal.

25 Comme visible sur la figure 2, qui représente, sous une forme très schématique, une cellule avant obtention du gigaseal (cellule de gauche) et une cellule après obtention du gigaseal (cellule de droite), la partie tronconique des cuvettes sert de
30 réceptacle aux cellules 18, tandis que leur partie cylindrique sert à la réalisation du gigaseal, ce

dernier étant, en effet, obtenu par déformation de la membrane plasmique desdites cellules et adhésion de cette membrane par invagination contre la paroi de ladite partie cylindrique.

5 A titre d'exemple, des cuvettes :

 - dont la partie tronconique mesure 50 μm au niveau de son plus grand diamètre, 30 μm au niveau de son plus petit diamètre et 10 μm de hauteur,

 - dont la partie cylindrique mesure 1,5 μm de diamètre et d'un moins d'un micron de hauteur, et

10 - qui surmontent un espace cylindrique présentant un diamètre de 50 μm de diamètre pour une hauteur de 450 μm ,

 se sont révélées particulièrement bien convenir à des
15 cellules de taille conventionnelles.

 On comprend dès lors que les plaques 121 et 123 du substrat 12 sont, de préférence, réalisées dans un matériau aisément micro-usinable, en particulier du silicium, la membrane intermédiaire 122 étant alors
20 préférentiellement constituée d'un matériau à forte constante diélectrique, propre à être micro-usiné de manière collective (microtechnologie) et à être assemblé par collage à une plaque de silicium. Un tel matériau est, par exemple, du dioxyde de silicium
25 (SiO_2) ou du nitrure de silicium (Si_3N_4) lorsque les plaques 121 et 123 sont réalisées en silicium.

 Le circuit imprimé 11 ou module A sert, conjointement avec le circuit imprimé 13 ou module C, à appliquer aux cellules 18 une tension électrique, via
30 le milieu liquide dans lequel elles baignent. Le circuit imprimé 11 sert, de plus, à enregistrer les

variations de cette tension induites par un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques desdites cellules.

De ce fait, les circuits imprimés 11 et 13, dont les supports isolants peuvent être réalisés dans un matériau conventionnel du type verre époxy, portent chacun, sur leur face en regard du substrat 12, neuf plots d'électrodes, respectivement 110 et 130, qui sont disposés de façon à ce que l'axe de chacun d'eux se confonde avec l'axe de la partie cylindrique d'une cuvette, et qui sont prévus pour être reliés à un circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique (non représenté sur les figures 1 et 2).

Ainsi, par exemple, les plots d'électrodes 130 du circuit imprimé 13 peuvent être reliés à une source à potentiel constant, par exemple la terre, tandis que les plots d'électrodes 110 du circuit imprimé 11 peuvent être connectés à la fois à un générateur électrique, via un amplificateur, et à un circuit d'adressage propre à permettre le recueil séquentiel des variations de tension électrique enregistrées par ces plots. Ce circuit d'adressage peut être lui-même relié, également via un amplificateur, à un appareil capable de mesurer la variation d'une grandeur électrique comme un voltmètre ou un ampèremètre, et qui est raccordé à la même source de potentiel constant que celle à laquelle les plots d'électrodes 130 du circuit imprimé 13 sont connectés.

Le fonctionnement du circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique,

ainsi que l'analyse des données recueillies sont, de préférence, gérés par un système informatique analogue à ceux déjà utilisés dans le domaine du patch-clamp.

Par ailleurs, le circuit imprimé 11 est
5 traversé par neuf canaux 111 de microfluidique, de quelques centaines de microns de diamètre, et dont la fonction est de permettre la création par aspiration, dans les espaces cylindriques 125, de la dépression
nécessaire à l'obtention du gigaseal. De ce fait, ces
10 canaux 111 traversent les plots d'électrodes 110 et sont prévus pour être reliés, au niveau de la face externe du circuit imprimé 11, à des capillaires (non représentés sur les figures 1 et 2), lesquels sont eux-mêmes connectés à un ou plusieurs systèmes d'aspiration
15 tels que classiquement utilisés pour aspirer un liquide (trompes à eau par exemple).

Le circuit imprimé 13 est également traversé par des canaux de microfluidique, de quelques centaines de microns de diamètre, mais ceux-ci sont au
20 nombre de dix-huit et se répartissent en neuf canaux 131 dont la fonction est de permettre l'introduction de substances dans les chambres 19, et neuf canaux 132 dont la fonction est de permettre l'évacuation de ces substances hors desdites chambres. Les canaux 131 et
25 132 peuvent également être utilisés pour assurer une recirculation desdites substances à l'intérieur des chambres 19.

Dans la forme de réalisation du dispositif selon l'invention montrée sur la figure 1, les canaux
30 131 et 132 sont disposés de part et d'autre des plots d'électrodes 130. Comme les canaux 111, ils sont prévus

pour être reliés à des capillaires (non représentés sur les figures 1 et 2), qui sont eux-mêmes connectés à un ou plusieurs systèmes de distribution de liquides (microseringues, micropompes, ...) et à un ou plusieurs systèmes d'aspiration de liquides ou encore à un ou plusieurs systèmes propres à assurer une recirculation des substances dans les chambres 19.

Là également, le fonctionnement de ces différents systèmes de distribution, d'aspiration ou de recirculation est, de préférence, géré par un système informatique.

Comme précédemment mentionné, deux joints 14 et 15, qui correspondent à deux modules D, sont intercalés entre le circuit imprimé 11 et le substrat 12 pour le premier, et entre ce substrat et le circuit imprimé 13 pour le deuxième, en vue d'assurer l'étanchéité du dispositif, notamment entre les chambres 19, et d'amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant.

Pour ce faire, ces joints sont munis de perforations circulaires, respectivement 140 et 150, qui présentent un diamètre légèrement supérieur à la fois au diamètre le plus large des cuvettes et au diamètre des espaces cylindriques 125 et dont l'axe se confond avec l'axe de ces cuvettes et de ces espaces cylindriques.

Par ailleurs, ces joints, qui peuvent ne faire que quelques microns d'épaisseur, sont constitués d'un matériau éventuellement souple, légèrement compressible et étanche aux liquides, lequel est, de

préférence, un élastomère comme un élastomère silicone tel qu'un polydiméthylsiloxane (PDMS).

Par ailleurs, ils sont, de préférence, fabriqués par moulage de manière à ce que, d'une part, ils soient parfaitement adaptés à la configuration du substrat 12, et, d'autre part, leur coût de fabrication soit suffisamment faible pour qu'ils puissent être remplacés par des joints neufs à chaque nouvelle utilisation du dispositif 10.

Les pinces, qui correspondent à deux modules E, ont pour fonction de maintenir les modules A, B, C et D, une fois ceux-ci assemblés les uns aux autres. De section droite en U et de longueur sensiblement égale aux bords des circuits imprimés 11 et 13, elles sont aptes à s'emboîter sur les bords de l'empilement constitué par lesdits modules après application d'une légère pression sur cet empilement.

On se réfère à présent aux figures 3 à 5 qui montrent une portion d'un dispositif 10, dans trois variantes de réalisation qui se distinguent entre elles et de la forme de réalisation représentée sur les figures 1 et 2, par la disposition des canaux 131 et 132 de microfluidique.

Dans la variante de réalisation montrée sur la figure 3, les canaux 131 et 132 traversent tous deux le plot d'électrode 130.

Dans la variante de réalisation montrée sur la figure 4, un seul de ces canaux, par exemple le canal 131 traverse le plot d'électrode 130, le canal 132 étant, lui, disposé latéralement à ce plot d'électrode, tandis que, dans la variante de

réalisation montrée sur la figure 5, les deux canaux 131 et 132 sont disposés latéralement et du même côté dudit plot d'électrode.

La figure 6 montre, elle, une portion d'un substrat 12 destiné à entrer dans la constitution d'un dispositif 10, dans une variante de réalisation conçue pour mesurer l'activité électrique de grosses cellules, c'est-à-dire de cellules mesurant de l'ordre de 0,7 à 1 mm de diamètre.

Dans cette variante de réalisation, le substrat 12 comprend, sur la plaque 121, un film 126 qui est constitué d'un matériau éventuellement souple, biocompatible tel qu'un PDMS, une résine ou un thermoplastique, et qui est muni d'ouvertures 127. Ces dernières sont dimensionnées de telle sorte que les cuvettes comprennent dans ce cas deux parties tronconiques superposées : une première partie, qui correspond aux évidements réalisés dans la plaque 121, et une seconde partie, qui correspond aux ouvertures 127 du film 126.

A titre d'exemple, des cuvettes :

- dont la première partie tronconique mesure 500 μm au niveau de son plus grand diamètre, 300 μm au niveau de son plus petit diamètre et une hauteur de 450 μm ,

- dont la seconde partie tronconique mesure 1 mm au niveau de son grand diamètre, 600 μm au niveau de son plus petit diamètre et 1 mm de hauteur, et

- dont la partie cylindrique mesure 1,5 μm de diamètre et moins d'un micron de hauteur, ont donné d'excellents résultats.

Là également, on préfère que le film 126 soit réalisé par moulage de manière à ce que son coût de fabrication soit suffisamment bas pour qu'il puisse, comme les joints 14 et 15, être remplacé par un film
5 neuf à chaque nouvelle utilisation du dispositif 10.

Dans le cas où il est destiné à servir à la mesure de l'activité électrique de cellules de taille conventionnelle, le substrat 12 peut être réalisé à base de silicium, par exemple par un procédé comprenant
10 les étapes suivantes :

a) la préparation de la plaque 123 par :

- polissage, sur ses deux faces, d'une première plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur d'environ 450 μm ;

15 - dépôt, sur les deux faces de la plaque de silicium ainsi polie, d'une couche de SiO_2 ;

- réalisation, dans l'épaisseur de l'une des deux couches de SiO_2 d'ouvertures cylindriques d'environ 1,5 μm de diamètre ; et

20 - réalisation, dans l'épaisseur de l'autre couche de SiO_2 et de la plaque de silicium, d'évidements cylindriques de 50 μm de diamètre par gravure chimique profonde, en veillant à ce que l'axe de ces évidements se confonde avec celui des ouvertures
25 réalisées à l'étape précédente ;

b) la solidarisation, par collage moléculaire, de la plaque 123 ainsi obtenue avec une seconde plaque de silicium préalablement polie sur ses deux faces, cette dernière étant destinée à former la future plaque
30 121 ;

c) le polissage de cette deuxième plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur de 10 μm ;

d) le dépôt, sur cette deuxième plaque de silicium, d'une couche de SiO_2 ou de Si_3N_4 , et

5 e) la réalisation, dans l'épaisseur de la couche de Si_3N_4 et de la deuxième plaque de silicium, d'évidements tronconiques.

Dans le cas où il est destiné à servir à la mesure de l'activité électrique de grosses cellules, le
10 substrat 12 peut être réalisée à base de silicium, par exemple par un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la préparation de la plaque 123 comme précédemment décrit ;

15 b) la préparation de la plaque 121 par :

- polissage, sur ses deux faces, d'une deuxième plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur d'environ 450 μm ;

20 - dépôt, sur les deux faces de la plaque de silicium ainsi polie, d'une couche de SiO_2 ou de Si_3N_4 ;

- réalisation, dans l'épaisseur de l'une des deux couches de SiO_2 ou de Si_3N_4 , d'ouvertures cylindriques d'environ 500 μm de diamètre ;

25 - réalisation à partir de ces ouvertures, d'évidements tronconiques dans l'épaisseur de la plaque de silicium par gravure chimique profonde ;

c) la solidarisation, par collage moléculaire,
de la plaque 121 ainsi obtenue avec la plaque 123, puis
30 éventuellement ;

d) le collage ou l'adhésion par simple pression d'un film 126 sur la plaque 121.

L'utilisation du dispositif 10 est extrêmement simple.

5 En effet, après avoir déposé un module D sur un module A, puis un module B adapté à la taille des cellules dont on veut mesurer l'activité électrique, sur le module D, on remplit les cuvettes du module B d'un milieu extracellulaire ou apte à servir
10 de milieu extracellulaire, ce milieu devant être capable d'assurer à la fois la conduction d'un courant électrique et la survie des cellules.

 On aspire l'air présent dans les espaces cylindriques 125 à l'aide des canaux 111 de
15 microfluidique, pour permettre au milieu extracellulaire de s'écouler dans ces espaces. On renouvelle cette opération jusqu'au remplissage complet des espaces cylindriques 125, puis des cuvettes par ledit milieu extracellulaire.

20 On dépose les cellules dans ces dernières, à raison d'une cellule par cuvette, et on aspire de nouveau, par les canaux 111 de microfluidique, dans les espaces cylindriques 125 pour obtenir un scellement de haute résistance entre chacune des cellules avec la
25 cuvette dans laquelle elle se trouve, puis éventuellement la rupture du fragment de membrane plasmique ainsi scellé si l'on souhaite travailler en configuration "whole-cell".

 Une fois ce scellement obtenu pour toutes
30 les cellules, on recouvre le module B d'un module D, puis le module D par un module C et, après application

d'une légère pression sur l'empilement des modules A, B, C et D résultant, on procède à la fixation des modules E.

On connecte le dispositif 10 au circuit
5 d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique et on procède aux mesures de l'activité électrique des cellules exactement comme dans la technique de patch-clamp originelle, à ceci près que
10 les substances à tester ou à détecter sont introduites dans les chambres 19 par l'intermédiaire des canaux 131 de microfluidique.

Lorsque les tests sont terminés, le dispositif 10 peut être aisément démonté en vue d'une nouvelle utilisation. En effet, il suffit, après
15 déconnexion du système d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique, de retirer les modules E, pour être en mesure de séparer les modules A, B, C et D les uns des autres. Les modules A, B et C peuvent être réutilisés après un lavage approprié,
20 tandis que les modules D sont jetés pour être remplacés par des modules neufs lors d'une utilisation ultérieure dudit dispositif.

L'invention ne se limite nullement au mode de réalisation qui vient d'être décrit. Ainsi, par
25 exemple, le dispositif selon l'invention est susceptible d'être adapté à la mesure en parallèle de d'activité électrique d'un nombre beaucoup plus important de cellules, par exemple de 1000 cellules, voire plus, auquel cas le substrat 12 est conçu pour
30 recevoir ce nombre de cellules.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 [1] HAMILL et al. *Pflügers Arch.*, 1981, 391:85-100
[2] WO-A-96/13721
[3] WO-A-01/25769
[4] WO-A-01/71349
[5] WO-A-99/66329
[6] WO-A-99/31503
10 [7] WO-A-01/59447

REVENDICATIONS

1. Dispositif (10) de mesure de l'activité électrique d'au moins un élément biologique, comprenant
 5 un substrat (12) sensiblement plan, qui comporte une face inférieure et une face supérieure et qui présente au moins une ouverture (120) pour le logement de cet élément (18), caractérisé en ce que :

- il comprend deux plaques (11, 13)
 10 sensiblement planes, qui sont disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, chacune de ces plaques étant munie, sur sa face disposée en regard du substrat, d'au moins une électrode (110, 130), cette électrode étant située en
 15 vis-à-vis de l'ouverture (120) du substrat (12) ;

- ces plaques et l'ouverture (120) du substrat (12) délimitent une chambre (19) qui est remplie, en condition d'utilisation du dispositif, d'un milieu liquide ; et

20 - chacune des plaques (11, 13) disposée de part et d'autre du substrat (12) comporte au moins un canal qui prend naissance à l'intérieur de ladite chambre et qui relie cette dernière à l'extérieur du dispositif.

25

2. Dispositif (10) selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'ouverture (120) du substrat (12) comprend une partie supérieure, une partie médiane
 -----et une partie inférieure-----coaxiales, les parties
 30 supérieure et médiane formant une cuvette pour le logement de l'élément biologique (18), tandis que la

partie inférieure forme un espace (125) apte à loger un volume de milieu liquide suffisant pour qu'il soit possible d'y créer, par aspiration, une dépression propre à induire un scellement entre ledit élément et ladite cuvette d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm.

3. Dispositif (10) selon la revendication 2, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) est de forme tronconique, tandis que la partie médiane de cette ouverture est de forme cylindrique.

4. Dispositif (10) selon la revendication 3, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) a son plus grand diamètre compris entre 20 et 100 μm , son plus petit diamètre compris entre 10 et 30 μm et une hauteur comprise de 10 à 50 μm , tandis que la partie médiane de cette ouverture a un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm et une hauteur inférieure ou égale à 100 μm .

5. Dispositif (10) selon la revendication 3, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) a son plus grand diamètre compris entre 500 μm et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600 μm et une hauteur comprise entre 300 μm et 10 mm, tandis que la partie médiane de cette ouverture présente un diamètre compris

entre 0,1 et 1 μm et une hauteur inférieure ou égale à 100 μm .

5 6. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la partie inférieure de l'ouverture (120) du substrat (12) est cylindrique et mesure entre 10 et 100 μm de diamètre pour une hauteur de 300 à 700 μm .

10 7. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (12) est constitué d'un ou plusieurs matériaux micro-usinables.

15 8. Dispositif (10) selon la revendication 7, caractérisé en ce que le substrat (12) est à base de silicium.

20 9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (12) est formé de deux plaques (121, 123) de silicium superposées, qui sont solidaires d'une membrane (122) intermédiaire constituée d'un matériau isolant.

25

10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) est ménagée dans
~~l'une des plaques de silicium, la partie médiane de~~
30 cette ouverture est ménagée dans la membrane intermédiaire, tandis que la partie inférieure de

ladite ouverture est ménagée dans l'autre des plaques de silicium.

11. Dispositif (10) selon l'une quelconque
5 des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que le substrat (12) comprend de plus, sur sa face supérieure, un film (126) qui est constitué d'un matériau biocompatible et qui est muni d'au moins une ouverture (127), cette ouverture étant coaxiale avec la partie
10 supérieure de l'ouverture sous-jacente du substrat, de même géométrie qu'elle et de section supérieure à la sienne.

12. Dispositif (10) selon la revendication
15 11, caractérisé en ce que l'ouverture du film (126) est tronconique et a son plus grand diamètre compris entre 500 μm et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600 μm et une hauteur comprise entre 300 μm et 1 mm.

20 13. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat sont
25 constituées d'un matériau isolant, et en ce que les électrodes (110, 130) portées par ces plaques sont des électrodes planes, notamment des plots d'Ag/AgCl⁻.

14. Dispositif (10) selon l'une quelconque
30 des revendications précédentes, caractérisé en ce que la plaque (13) disposée en regard de la face supérieure

du substrat (12) comporte deux canaux (131, 133) dont l'un sert à l'introduction de substances dans la chambre (19), tandis que l'autre sert à l'évacuation de ces substances hors de cette chambre.

5

15. Dispositif (10) selon la revendication 14, caractérisé en ce que les canaux (131, 133) que comporte la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat (12) traverse verticalement
10 cette plaque.

16. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le canal (111) que comporte la plaque (11) disposée en
15 regard de la face inférieure du substrat (12) traverse verticalement cette plaque.

17. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que
20 l'ouverture (120) du substrat (12), les électrodes (110, 130) portées par les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et le canal (111) que comporte la plaque (11) disposée en regard de la face inférieure du
25 substrat sont coaxiaux.

18. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (14, 15) pour étancher la chambre
30 (19) et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant.

19. Dispositif (10) selon la revendication 16, caractérisé en ce que les moyens pour étancher la chambre et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant consistent en un premier joint (14), qui est intercalé entre le substrat (12) et la plaque (11) disposée en regard de la face inférieure de ce substrat, et en un deuxième joint (15), qui est intercalé entre le substrat (12) et la plaque (13) disposée en regard de la face inférieure de ce substrat, chacun de ces joints étant muni d'au moins une perforation (140, 150) qui est disposée et dimensionnée de manière à circonscrire l'électrode située sur la plaque au contact de laquelle il se trouve.

20. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (12), les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat (12), et les moyens (14,15) pour étancher la chambre et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant, lorsque ces derniers sont présents, sont des modules qui sont assemblés de manière amovible.

21. Dispositif (10) selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (16, 17) pour maintenir, en condition d'assemblage, le substrat (12), les plaques (11, 13) qui sont disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure

de ce substrat et les moyens (14, 15) pour étancher la chambre et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant, lorsque ces derniers sont présents.

5

22. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, ce dispositif étant prévu pour mesurer en parallèle l'activité électrique de plusieurs éléments biologiques :

- le substrat (12) présente une pluralité d'ouvertures (120) identiques et régulièrement espacées les unes des autres ;
 - les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat sont des circuits imprimés qui sont munis chacun d'autant d'électrodes (110, 130) que le substrat (12) comporte d'ouvertures ;
 - la plaque (11) disposée en regard de la face inférieure du substrat comporte au moins autant de canaux (111) que le substrat (12) comporte d'ouvertures ;
 - la plaque (13) disposée en regard de la face supérieure du substrat comporte au moins autant de canaux (131) pour l'introduction de substances et au moins autant de canaux (132) pour l'évacuation de substances que le substrat comporte d'ouvertures ;
- ledit substrat et ses ouvertures, lesdites plaques, ~~lesdites électrodes et lesdits canaux étant tels que~~
- précédemment définis.

23. Dispositif (10) selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend deux joints identiques, munis chacun d'autant de perforations que le substrat comporte d'ouvertures, ces joints et ces 5 perforations étant tels que précédemment définis.

24. Dispositif (10) selon la revendication 22 ou la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend deux pinces identiques qui s'emboîtent sur les 10 bords de l'empilement constitué par le substrat, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les joints.

25. Application d'un dispositif (10) tel 15 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour le criblage de molécules à visée thérapeutique.

26. Application d'un dispositif (10) tel 20 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques.

27. Application d'un dispositif (10) tel 25 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour la détection de substances toxiques.

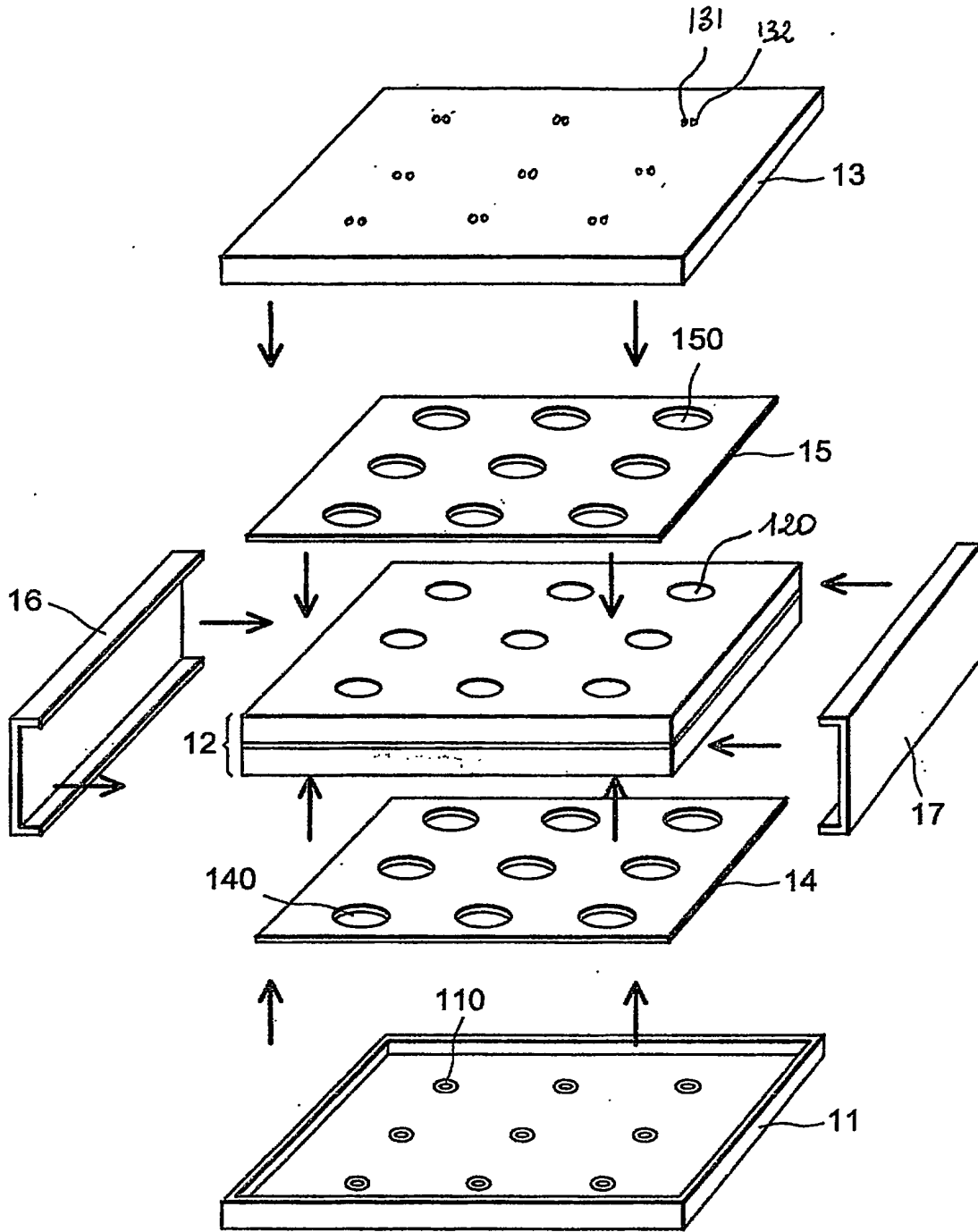


FIG. 1

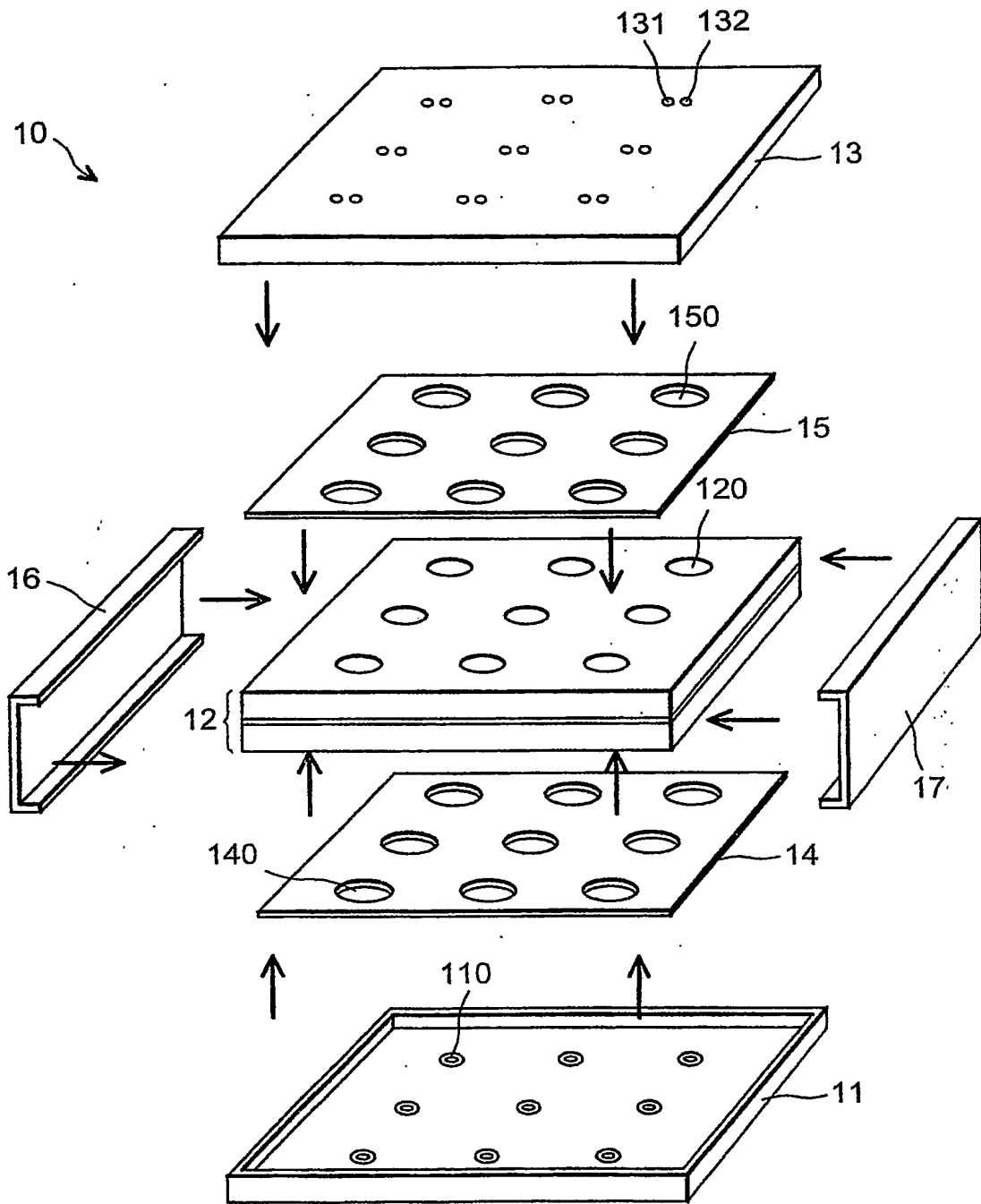


FIG. 1

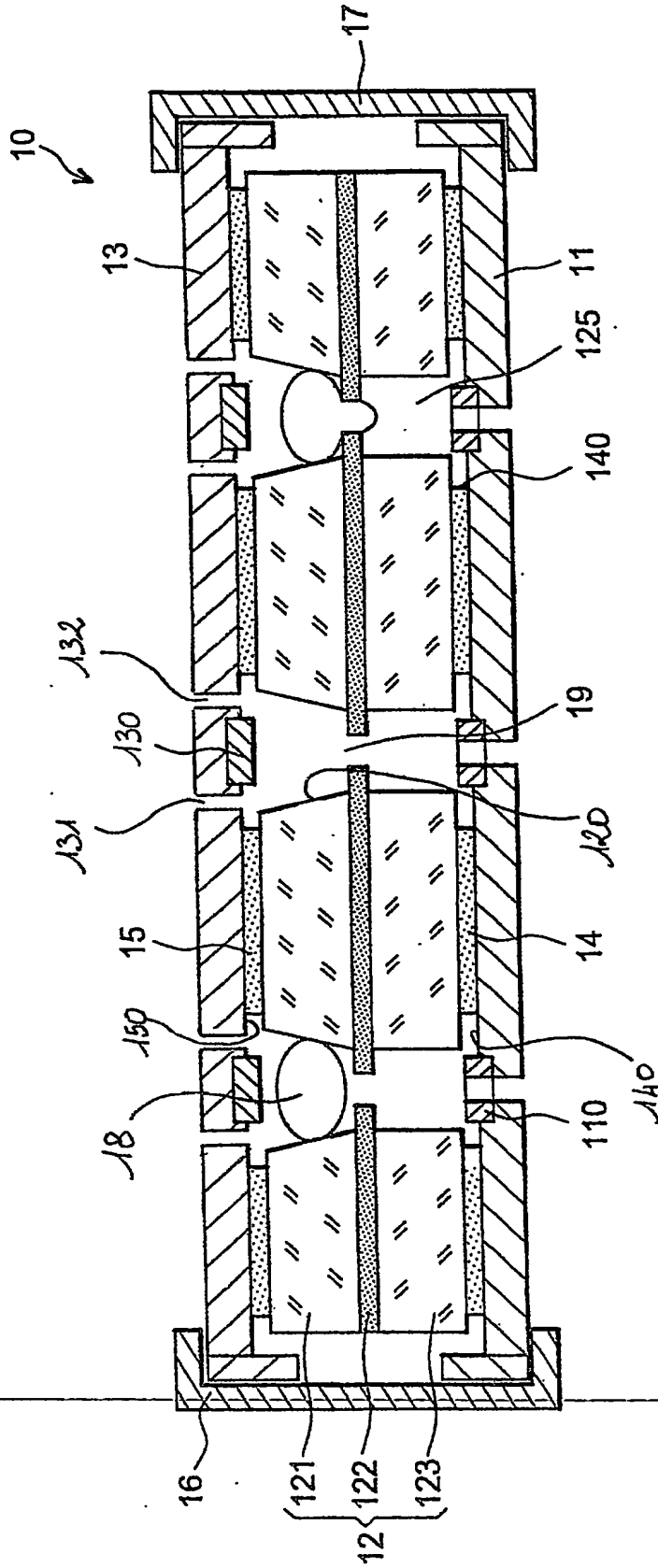


FIG. 2

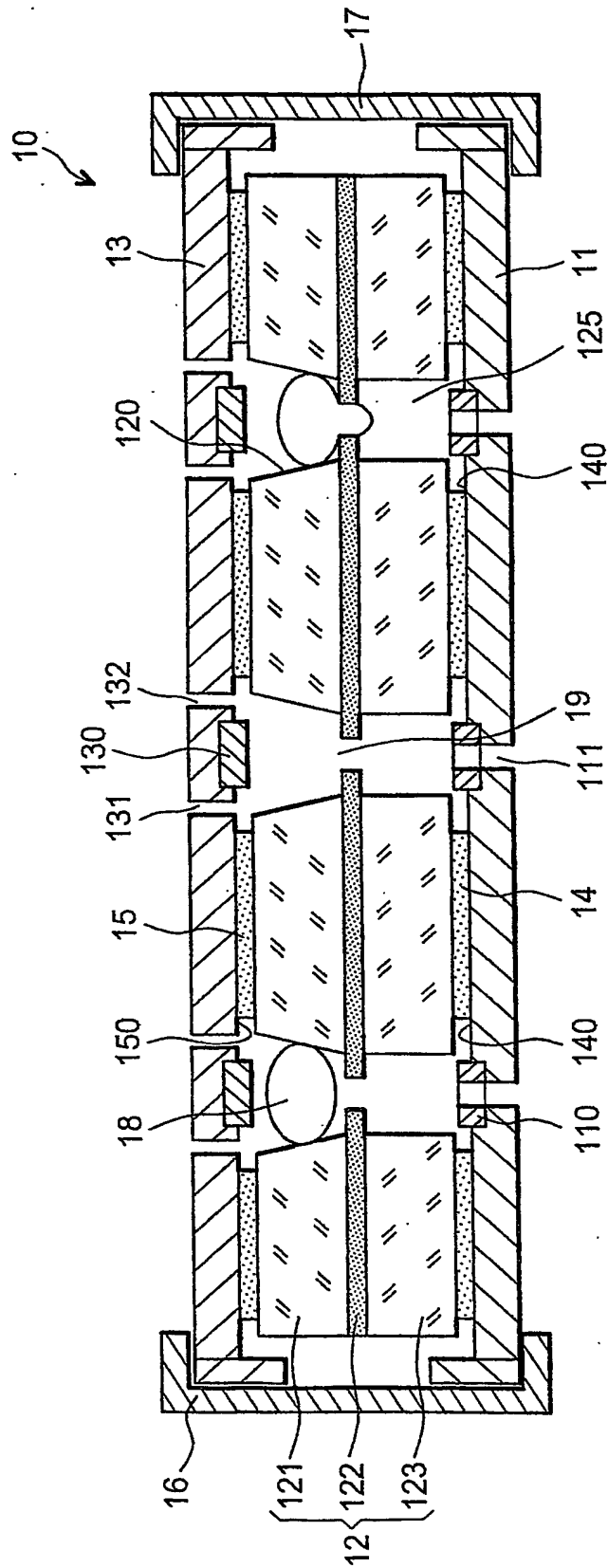


FIG. 2

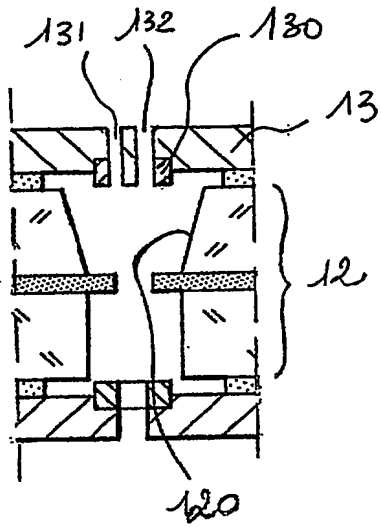


FIG. 3

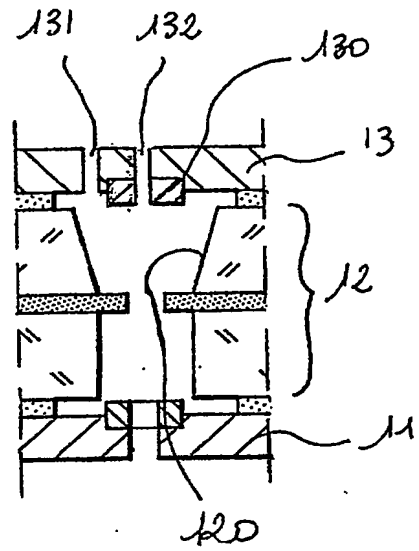


FIG. 4

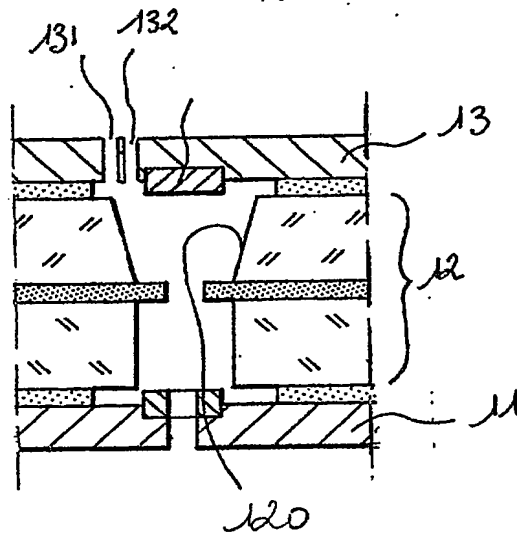


FIG. 5

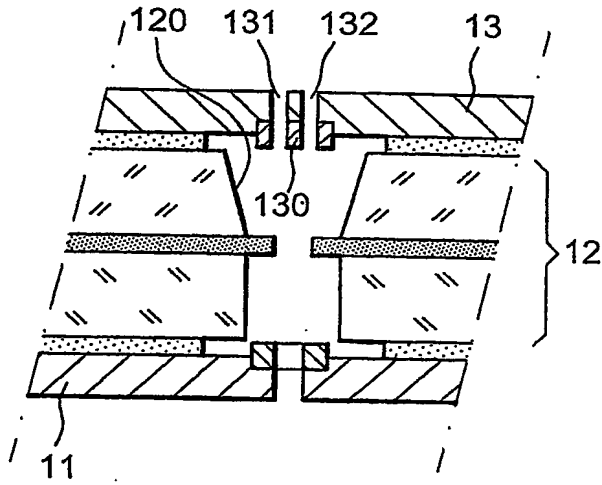


FIG. 3

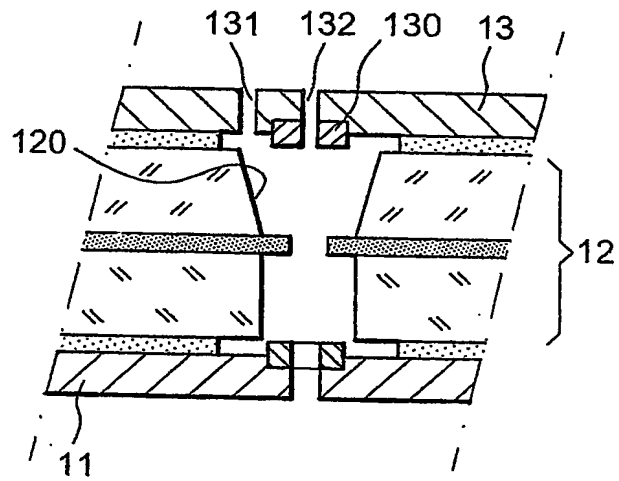


FIG. 4

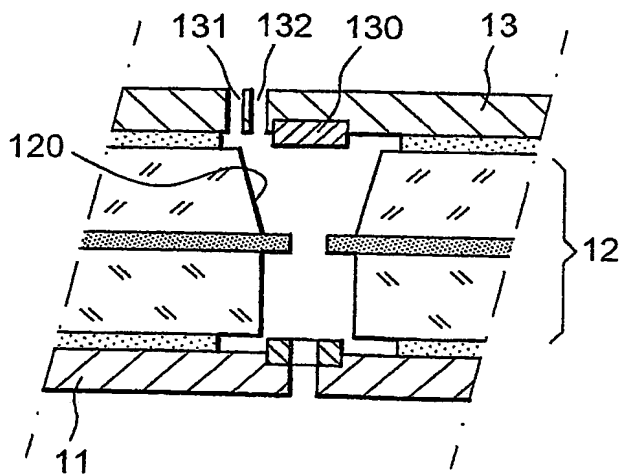


FIG. 5

414

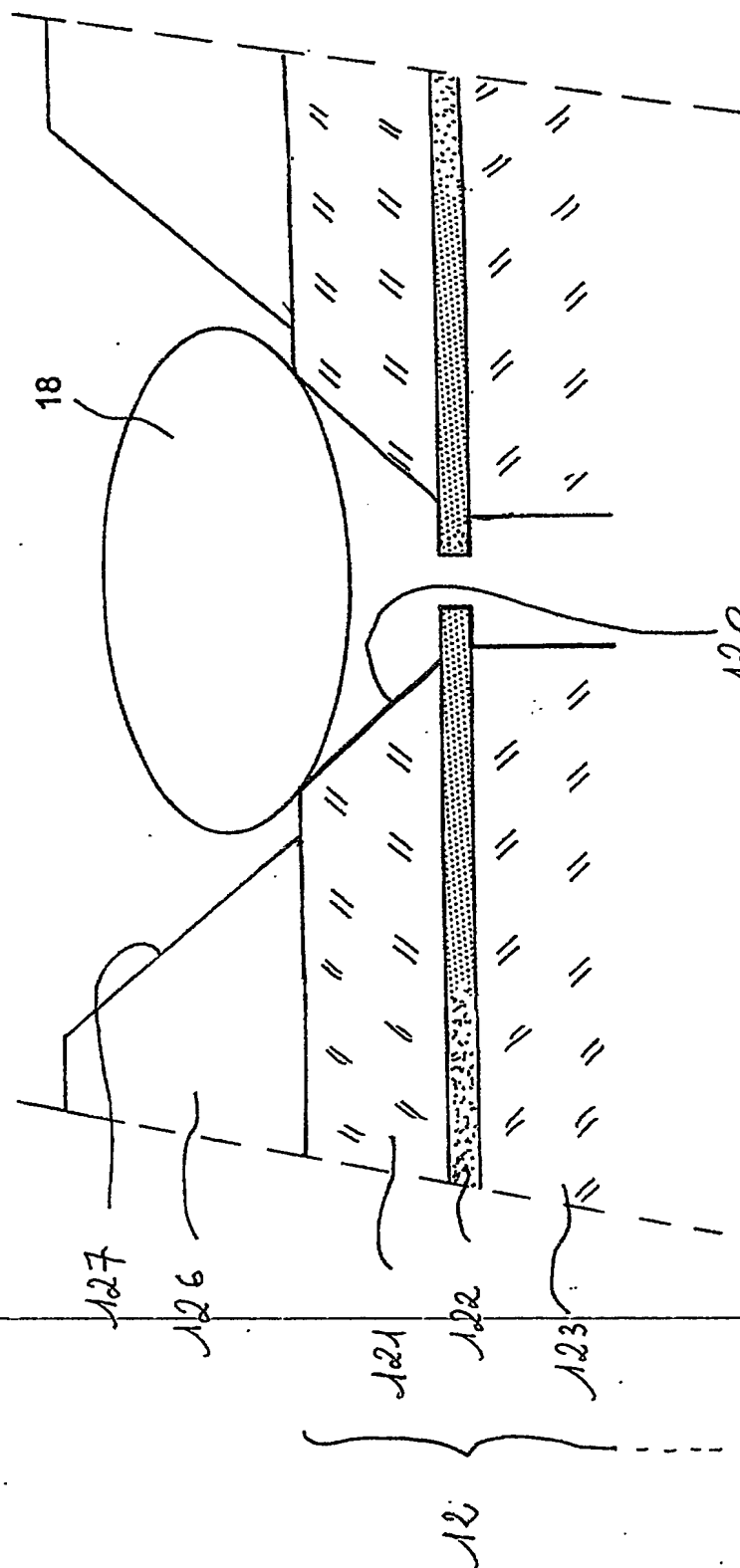


FIG. 6

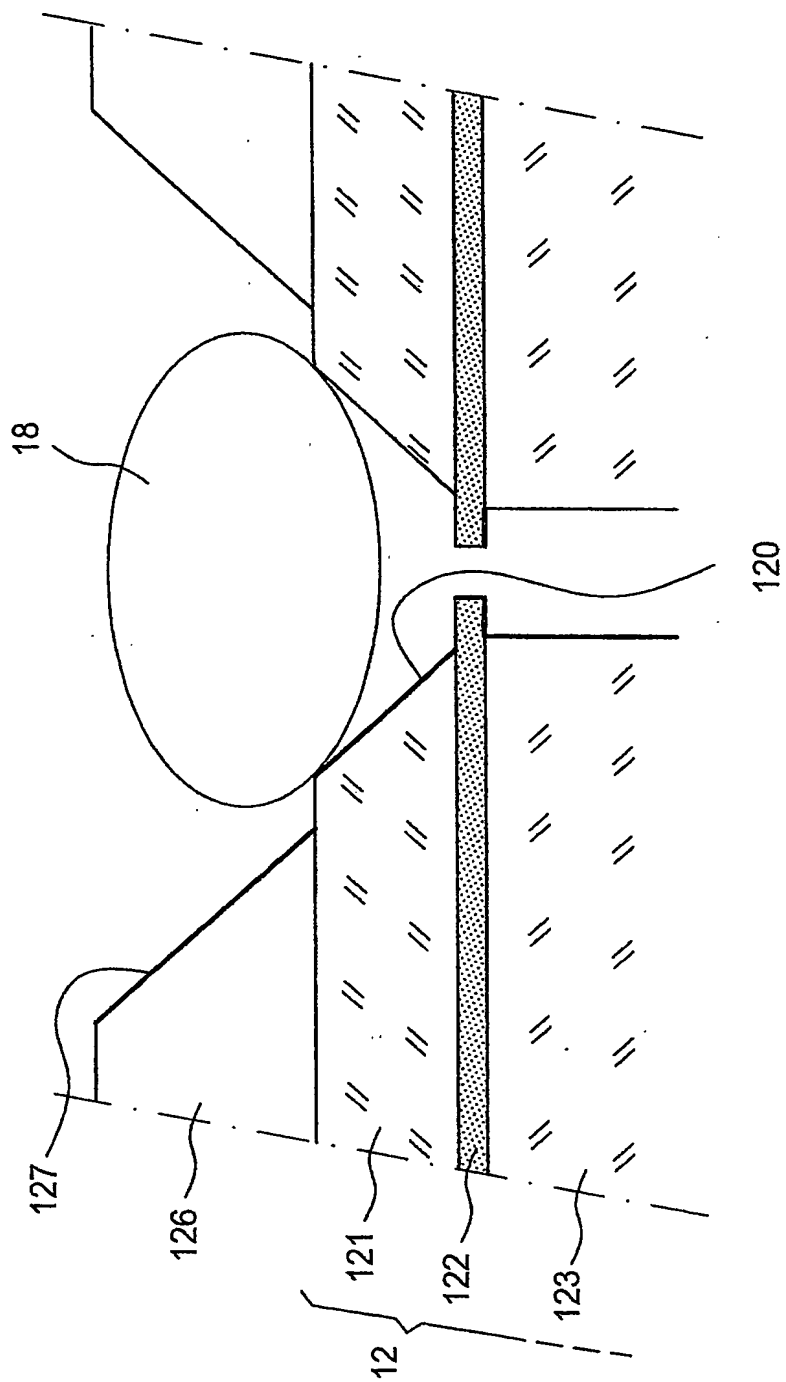


FIG. 6

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B 14141.3/SL	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.10663 du 28.08.2002	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE D'ELEMENTS BIOLOGIQUES ET SES APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PICOLLET-DAHAN	
Prénoms		Nathalie	
Adresse	Rue	Le Crozat	
	Code postal et ville	38580	LA FERRIERE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CAILLAT	
Prénoms		Patrice	
Adresse	Rue	10 rue de Provence	
	Code postal et ville	38130	ECHIROLLES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		REVOL-CAVALIER	
Prénoms		Frédéric	
Adresse	Rue	11 rue de la Saulne	
	Code postal et ville	38180	SEYSSINS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 03 Septembre 2002 S. LENOIR 422-5/002			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B 14141.3/SL	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.10663 du 28.08.2002	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE D'ELEMENTS BIOLOGIQUES ET SES APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHATELAIN	
Prénoms		François	
Adresse	Rue	413 rue Hector Berlioz Le Chevallon de Voreppe	
	Code postal et ville	38340	VOREPPE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 03 Septembre 2002 S. LENOIR 422-5/002			

PCT Application
PCT/EP2003/015044



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.